

⑤

Int. Cl. 2:

C 12 K 3/00

⑩

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 24 21 066 A1

⑪

Offenlegungsschrift 24 21 066

⑫

Aktenzeichen: P 24 21 066.0

⑬

Anmeldetag: 2. 5. 74

⑭

Offenlegungstag: 25. 3. 76

⑮

Unionspriorität:

⑮ ⑮ ⑮

⑯

Bezeichnung: Bifidobakterien enthaltendes Präparat

⑰

Zusatz zu: P 21 34 179.7

⑱

Anmelder: Solco Basel AG, Basel (Schweiz)

⑲

Vertreter: Zumstein sen., F., Dr., Assmann, E., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Koenigsberger, R., Dipl.-Chem. Dr.; Holzbauer, R., Dipl.-Phys.;
Zumstein jun., F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑳

Erfinder: Schuler, Rolf, Dr.; Schuler geb. Malyoth, Eleonore; 8131 Berg

BEST AVAILABLE COPY

DT 24 21 066 A1

SOLCO BASEL AG, Basel / Schweiz
=====

Bifidobakterien enthaltendes Präparat

Die Erfindung betrifft ein Präparat zur Substitution einer gestörten Darmflora bzw. zur Aufrechterhaltung einer normalen Darmflora, enthaltend als Mischung mehrere Arten der Gattung Bifidobakterien, gemäß P 21 34 179.7.

Wie in der Hauptanmeldung im einzelnen erläutert ist, lassen sich mit einem Präparat, das als Mischung mehrere Arten der Gattung Bifidobakterien enthält, anhaltende therapeutische Erfolge bei der Substitution einer gestörten Darmflora erzielen.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, das Präparat gemäß der Hauptanmeldung noch dahin weiterzuentwickeln, daß die Ansiedlung der zugeführten Bifidobakterien im Darm wesentlich begünstigt wird.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Präparat außer den verschiedenen Arten von Bifidobakterien noch einen Zusatz von *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* enthält.

Es ist bekannt, daß verschiedene Lactobazillen bzw. deren Stoffwechselprodukte die Darmflora im positiven oder negativen Sinn beeinflussen können. So ist beispielsweise *Lactobacillus acidophilus* ein regelmäßiger Bewohner des menschlichen Darmkanales, und es ist auch versucht worden, Darmstörungen durch die Zufuhr von Lb, *acidophilus* oder dessen Stoffwechselprodukten günstig zu beeinflussen.

609813/0824

- 2 -

Nachweislich positive Ergebnisse sind jedoch bei diesen Versuchen nicht erzielt worden. *Lb. bulgaricus*, bekannt als Joghurtbakterium, übt bei vielen Personen nachteilige Wirkungen aus. Andere *Lactobacillen* sind im Darm überhaupt nicht lebensfähig.

Demgegenüber erwies sich der erfindungsgemäß als Zusatz vorgesehene *Lb. casei* var. *Rhamnosus* überraschend als sehr geeignet zur Herbeiführung einer verbesserten Ansiedlung der *Bifidobakterien*. Dieser Keim ist nämlich mit Sicherheit völlig apathogen und übt auch keinen Einfluß auf die Darmflora in ihrer Gesamtheit aus. Er bleibt im Darm voll lebensfähig und stoffwechselaktiv, ist jedoch nicht in der Lage, sich im Darmkanal dauerhaft anzusiedeln.

Die Ursache für die durch den *Lb. casei* var. *Rhamnosus* verbesserte Ansiedlung der *Bifidobakterien* liegt in folgendem: *Bifidobakterien* benötigen zu ihrem optimalen Anwachsen in ihrer Umgebung einen pH-Wert von 5,6 bis 6,2, sind jedoch im Darm meist nicht in der Lage, sich diesen pH-Wert durch eigene Säuerungsaktivitäten zu schaffen. Sie können jedoch, wenn sie einmal bei diesem pH-Wert angesiedelt sind, ihren optimalen Säurewert aufrechterhalten. *Lb. casei* var. *Rhamnosus* schafft nun - ohne seinerseits ein Ansiedlungsvermögen im Darm zu besitzen - einen für die Ansiedlung der *Bifidobakterien* optimalen pH-Wert.

Der erfindungsgemäß vorgesehene Zusatz von *Lb. casei* var. *Rhamnosus* liefert also für die erwünschte Ansiedlung der *Bifidobakterien* im Darm eine "Schutzmantelflora".

609813/0824

- 3 -

Der für die Erfindung ausgewählte Lb.-Stamm zeichnet sich durch folgende biochemische Eigenschaften aus:

Lb. casei var. Rhamnosus

Lev.	Malt.	Suc.	Sal.	Treh.	Cell.	Mann.	Rham.	Melb.
+	+	+	+	+	+	+	+	-
Raff.	Arab.	Xyl.	Inul.	Melez	Sorbose	Dul.	Sorbit	Inositol
-	-	-	-	+	+	+	+	+

Zur weiteren Erläuterung der Erfindung sei die Herstellung eines erfindungsgemäßen Präparates an einem

Beispiel

näher erläutert:

Zur Herstellung des Präparates werden sieben verschiedene Stämme von Bifidobakterien verwendet. Die Stämme werden aus gesunden Versuchspersonen isoliert und über übliche Kulturverfahren reingezüchtet. Die Auswahl der zu verwendenden Stämme erfolgt in Anlehnung an das von Dehnert gegebene Schema.

Die reingezüchteten Stämme werden dann über mehrere Passagen hinweg an rasches und üppiges Wachstum in Milch adaptiert und die so erhaltenen Kulturen auf ein gewünschtes Volumen gebracht (z.B. 50 oder 100 ml). Zur Herstellung einer größeren Kulturmenge wird sodann folgendermaßen verfahren:

Magermilchpulver wird mit Leitungswasser aufgelöst und zwar so, daß eine "Milch" mit erhöhter Trockenmasse entsteht (also z.B. 1 kg Magermilchpulver mit Wasser anrühren und mit Wasser bis zu einem Endvolumen von 5 l auffüllen).

609813/0824

Zu dieser Lösung wird dann noch 1% Hefeextraktpulver gegeben und die gesamte Lösung dann zur weitgehenden Abtötung unerwünschter Begleitkeime in strömendem Dampf erhitzt. Sofern im Hefeextrakt extrem hitzeresistente Keime enthalten sein sollten, wird der Hefeextrakt nicht als Pulver, sondern in Form einer hochkonzentrierten, vorher autoklavierten Lösung der Milch zugegeben.

Das gesamte Nährstoffgemisch wird sodann auf 37°C bis 42°C gekühlt und entweder gleichzeitig oder in zeitlichen Abständen mit den verschiedenen Bifidokulturen beimpft. Die Impfmenge der einzelnen Kulturen ist hierbei so zu bemessen, daß nach Zugabe der letzten Kultur der gesamte Zusatz an Bifidokulturen etwa 10% bis 20% des Nährstoffgemisches ausmacht. Das so beimpfte Gemisch wird dann für mehrere Stunden bei 37°C bis 42°C bebrütet. In Abständen von etwa 1 Std. wird jeweils eine pH-Messung durchgeführt; sofern der pH-Wert unter einen Wert von 5,0 abgesunken ist, wird das Gemisch durch Zugabe von Calciumhydroxid wieder auf einen pH-Wert von 5,9 bis 6,0 angehoben. Nach Ablauf der fünften Bebrütungsstunde wird dem Gemisch, in dem sich mittlerweile die Bifidobakterien reichlich vermehrt haben, noch 5% bis 10% einer Reinkultur von *Lactobacillus casei* zugegeben. Die Bebrütung wird dann, wiederum unter pH-Korrektur, für weitere 2 bis 3 Stunden fortgesetzt. Anschließend wird die gesamte Kultur gekühlt und kann nun entweder frisch oder in schonend getrockneter Form verwendet werden.

Zur weiteren Erläuterung des mit der Erfindung erzielten technischen Fortschritts seien im folgenden einige

klinische Ergebnisse

beschrieben. Nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnene

609813/0824

und durch Lyophilisation getrocknete Kulturen wurden an Patienten mit folgenden Syndromen verabfolgt:

1. Darmstörungen nach antibiotischer Therapie

Es ist bekannt, daß im Verlauf einer antibiotischen Therapie, insbesondere, wenn diese über einen längeren Zeitraum durchgeführt wird, durch die Schädigung der Darmflora sehr ernsthafte Darmstörungen auftreten. Es wurden in einem klinischen Versuch 20 Patienten, die unter solchen Darmstörungen litten, mit dem Präparat behandelt und mit einer Kontrollgruppe verglichen, die zwar auch Antibiotica erhalten hatte, bei der sich aber die anschließenden Maßnahmen zur Behebung der Darmstörungen auf bisher übliche klinische Verfahren beschränkten. Eine Normalisierung der Darmfunktion trat bei den meisten Versuchspersonen bereits nach 3 Tagen ein, bei allen Versuchspersonen aber wesentlich früher als dies in der Kontrollgruppe zu beobachten war.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde bei mehreren Patienten während der Antibiotica-Therapie versucht, das Auftreten von Darmstörungen dadurch zu verhindern, daß die Versuchspersonen jeweils in den Intervallen zwischen den Antibioticagaben Gaben des Bifidogemisches erhielten. Bei allen Patienten konnte durch diese Maßnahme das Auftreten von Darmstörungen verhindert werden.

2. Colitis ulcerosa

Zwei Patienten mit ulcerierender Colitis, die seit mehreren Jahren bestand und sich als resistent erwiesen hatte, erhielten für die Dauer von 6 Wochen hohe Dosen (100 g Lyophilisat täglich) des Bifido-Bakteriengemisches. Beide Patienten zeigten erhebliche Besserung, die auch nach Absetzen des Präparates anhielt.

609813/0824

3. Chronische Obstipation

Eine größere Anzahl von Versuchspersonen, die an chronischer Obstipation litten, erhielten über einen längeren Zeitraum hinweg täglich 1 g Bifidusmischkultur. Alle Patienten zeigten eine Normalisierung der Darmfunktion nach kürzerer oder längerer Zeit, wobei diese Zeitspanne deutliche Abhängigkeit von der Schwere des Falles zeigte. In keinem Fall betrug die Therapiedauer mehr als 6 Wochen.

4. Lebererkrankungen

Es ist bekannt, daß bei der Behandlung von Lebererkrankungen die zahlenmäßige Reduktion des gramnegativen Anteils der aeroben Darmflora von erheblicher Bedeutung ist. Man verwendet aus diesem Grunde in der Behandlung verschiedener Lebererkrankungen seit längerer Zeit Antibiotica, die vorwiegend gegen diesen Anteil der Darmflora wirksam sind. Da diese Antibiotica selbst jedoch eine gewisse toxische Wirkung aufweisen, ist der Therapiedauer eine relativ enge Grenze gesetzt. Es hat nun gezeigt werden können, daß es auch mit Hilfe des beschriebenen Bifido-Mischpräparates möglich ist, den gramnegativen aeroben Anteil der Darmflora noch wirkungsvoller zurückzudrängen, als dies mit Antibiotica möglich war.

5. Säuglingsernährung

Man hat ferner, seit man die Bedeutung der Bifidusflora für den Säugling erkannt hat, immer wieder versucht, durch künstliche Ernährung im Säuglingsdarm eine Flore entstehen zu lassen, die derjenigen Flora gleicht, die sich beim Brustkind ausbildet. Hierbei hat sich gezeigt, daß

es zwar möglich ist, eine Bifidusflora aufzubauen, daß es sich aber hierbei niemals um jene Bifidusstämme handelt, die für das Brustkind spezifisch sind. Wenn man nun unter Heranziehung des oben beschriebenen Herstellungsverfahrens an Stelle von "Erachsenenstämmen" sog. "Brustkindstämmen" verwendet, so läßt sich ebenfalls eine Bifido-Mischkultur herstellen, die zweckmäßigerweise in getrockneter Form einer künstlichen Säuglingsernährung zugesetzt - auch beim künstlich ernährten Säugling eine der Brustkindflora identische Bifidusflora entstehen läßt.

Patentansprüche

- ① Präparat zur Substitution einer gestörten Darmflora bzw. zur Aufrechterhaltung einer normalen Darmflora, enthaltend als Mischung mehrere Arten der Gattung Bifidobakterien, gemäß P 21 34 179.7, g e k e n n - z e i c h n e t , durch einen Zusatz von *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus*.
2. Verfahren zur Herstellung eines Präparates nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein vorzugsweise unter Verwendung von Magermilchpulver und Hefeextrakt erzeugtes Milch-Nährstoffgemisch mit einer aus sieben verschiedenen Stämmen von Bifidobakterien erzeugten Bifidokultur beimpft und dann mehrere Stunden bei einer Temperatur zwischen 37 und 42°C unter Aufrechterhaltung eines pH-Wertes zwischen 5,0 und 6,0 bebrütet wird, wobei nach etwa fünf Stunden etwa 5 bis 10% einer Reinkultur von *Lactobacillus casei* var. *Rhamnosus* zugegeben und die Bebrütung anschließend noch für weitere zwei bis drei Stunden fortgesetzt wird.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.